

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC EN ABITIBI-TÉMISCAMINGUE

DÉVELOPPEMENT D'UN SILO EXPÉRIMENTAL À L'ÉCHELLE DU
LABORATOIRE À PARTIR DU MATÉRIEL VÉGÉTAL SEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

ACHORA BOUKHORS

DÉCEMBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche le docteur Pascal Drouin pour son encadrement continu et inconditionnel dans l'accomplissement de ce travail ainsi qu'au docteur Carole Lafrenière de son aide précieuse et ses directives.

Toute ma gratitude à M. Patrick Laplante et Mme Andrée Lebel pour leur aide et conseils techniques au niveau du laboratoire et à tout le personnel de l'Unité de Recherche et de Développement en Agroalimentaire de l'Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue.

Je tiens à exprimer aussi ma profonde gratitude au programme Novalait du Fonds Québécois de la Recherche Nature et Technologie pour le financement de mon projet permettant de me consacrer à ce travail.

Je dédie ce mémoire à mes très chers parents, qu'ils reposent en paix, et à ma famille.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| REMERCIEMENTS..... | ii |
| LISTE DES FIGURES..... | vi |
| LISTE DES TABLEAUX | vii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | viii |
| RÉSUMÉ | x |
| CHAPITRE I PROBLÉMATIQUE..... | 1 |
| CHAPITRE II REVUE DE LITTÉRATURE | 3 |
| 2.1 L'ensilage..... | 3 |
| 2.1.1 Phase aérobie | 3 |
| 2.1.2 Phase de fermentation | 4 |
| 2.1.3 Phase de stabilité anaérobie | 5 |
| 2.1.4 Phase d'alimentation | 5 |
| 2.2 Caractéristiques biochimiques des plantes..... | 6 |
| 2.2.1 Protéines..... | 6 |
| 2.2.2 Les sucres de la plante..... | 7 |
| 2.2.3 Le pouvoir tampon | 8 |
| 2.3 Silos expérimentaux | 8 |
| CHAPITRE III MATÉRIELS ET MÉTHODES..... | 12 |
| 3.1 Effet des modes de séchage sur les caractéristiques biochimiques et microbiologiques du matériel végétal | 12 |

| | | |
|-------------------------------|--|----|
| 3.1.1 | Méthode de séchage et préparation du matériel végétal | 12 |
| 3.1.2 | Mesure des caractéristiques biochimiques | 14 |
| 3.1.2.1 | Évaluation de la dégradation de la qualité des protéines | 14 |
| 3.1.2.2 | Dosage des sucres solubles..... | 15 |
| 3.1.2.3 | Mesure du pouvoir tampon..... | 16 |
| 3.1.3 | Survie des différents groupes de microorganismes à la déshydratation .. | 16 |
| 3.1.4 | Analyses statistiques..... | 16 |
| 3.2 | Évaluation de la technique des silos par un essai de répétitivité | 17 |
| 3.2.1 | Préparation et inoculation des silos | 17 |
| 3.2.2 | Détermination du pH des ensilages | 18 |
| 3.2.3 | Analyses statistiques..... | 18 |
| 3.3 | Utilisation de la technique des silos expérimentaux pour évaluer l'efficacité des bactéries lactiques | 21 |
| 3.3.1 | Préparation et ouverture des silos expérimentaux | 21 |
| 3.3.2 | Analyses biochimiques..... | 21 |
| 3.3.3 | Analyses statistiques..... | 23 |
| CHAPITRE IV | | |
| RÉSULTATS ET DISCUSSION | | 25 |
| 4.1 | Effet des modes de déshydratation sur les caractéristiques biochimiques et microbiologiques des plantes | 25 |
| 4.1.1 | Effet sur les caractéristiques biochimiques reliées à l'ensilabilité | 25 |
| 4.1.2 | Effets sur les teneurs en protéines et leur qualité | 28 |
| 4.1.3 | Effet sur les caractéristiques microbiologiques | 31 |
| 4.1.4 | Sélection des traitements du matériel végétal | 32 |
| 4.2 | Répétitivité des silos..... | 34 |
| 4.3 | Évaluation de l'efficacité des deux souches lactiques..... | 35 |

| | |
|------------------|----|
| CONCLUSION | 44 |
| RÉFÉRENCES | 45 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | Page |
|---|------|
| 1. Représentation de la luzerne (<i>Medicago sativa</i> L), une légumineuse fourragère | 13 |
| 2. Représentation de la fléole (<i>Phleum pratense</i> L.), une graminée fourragère | 13 |
| 3. Silo en sachet de polyéthylène après le scellage sous vide | 19 |
| 4. Silo en sachet de polyéthylène durant la formation du vide | 19 |
| 5. Appareil HI-TECH Vacuum-Nel utilisé pour le scellage sous vide des silos | 20 |
| 6. Comparaison de l'état des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE permettant de vérifier l'effet du mode de séchage sur la Protéine brute de deux espèces de plantes fourragères (fléole et luzerne) | 30 |
| 7. Ajustement de la cinétique du pH réalisé suite aux itérations effectuées par le modèle non linéaire de SAS pour l'étude des cinétiques d'acidifications des silos de fléole et de luzerne inoculés avec les souches de bactéries lactiques IA-38 et GIA-15 | 42 |
| 8. Dénombrements des bactéries lactiques réalisés sur les silos des cinq premières ouvertures suite à la mise en silo du matériel végétal de la fléole et de la luzerne inoculées par les souches de bactéries lactiques IA-38 et GIA-15 | 43 |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau | | Page |
|---------|---|------|
| 1. | Paramètres d'évaluation du potentiel d'ensilabilité pour les deux espèces végétales selon trois traitements de déshydratation | 26 |
| 2. | Indices de mesure de la dégradation des protéines suite au séchage des deux plantes fourragères selon trois modes de séchage différents | 27 |
| 3. | Moyenne des dénombrements microbiens pour les deux plantes pour chaque mode de séchage | 33 |
| 4. | Effet des souches de bactéries lactiques et des plantes sur la cinétique du pH | 39 |
| 5. | Analyse de variance des paramètres de fermentation des silos au jour 32 | 40 |
| 6. | Moyenne des valeurs des paramètres de fermentation des silos influencés par la souche et la plante après 32 jours de fermentation | 41 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| AGV | Acides gras volatils |
| A_w | Activité de l'eau |
| CO ₂ | Dioxyde de carbone |
| EDTA | Éthylène dinitrilo tetraacetic acid-disodium salt |
| FF | Fourrage frais |
| GIA-15 | Souche de bactérie lactique non efficace <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (0,1M) |
| IA-38 | Souche de bactérie lactique efficace <i>Pediococcus pentosaceus</i> . |
| KCl | Chlorure de potassium |
| kGy | kilogray |
| MEA | Malt Extract Agar |
| MgCl ₂ | Chlorure de magnésium |
| MRS | Milieu de Mann Rogosa et Sharp |
| MS | Matière sèche du matériel végétal |
| Na ₂ S ₂ O ₅ | Métabisulfite de sodium |
| NaOH | Hydroxyde de sodium |
| NH ₃ | Ammoniaque |
| N-NH ₃ | Azote ammoniacal |
| NPN | Azote non protéique |
| N-soluble-TCA | Azote soluble au TCA |
| N-total | Azote total |

| | |
|-----------------|--|
| OMAFRA | Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs |
| O ₂ | Oxygène |
| pH _w | pH de stabilité anaérobie |
| pKa | Constante de dissociation d'un acide |
| RCA | Reinforced Clostridial Agar |
| rpm | Révolution par minute |
| SDS-PAGE | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide au sulfate dodecyl de sodium |
| TCA | Acide trichloro-acétique |
| UFC | Unité formant des colonies |
| URDAAT | Unité de recherche et de développement en agroalimentaire de l'Abitibi-Témiscamingue |
| VRBGA | Violet red bile glucose agar |

RÉSUMÉ

L'ensilage est une façon de conserver les fourrages. Cette conservation est possible grâce aux bactéries lactiques qui, en utilisant les sucres, produisent de l'acide lactique ce qui permet d'abaisser le pH des fourrages et ainsi empêcher le développement d'une microflore pouvant diminuer leur qualité nutritive. Pour ce faire, l'efficacité des bactéries lactiques à abaisser le pH est importante. La sélection de bactéries lactiques efficaces nécessite des ressources importantes et est limitée à la saison de croissance, ce qui limite le nombre de souches pouvant être testées. La possibilité de tester des souches à n'importe quel moment durant l'année est donc un enjeu important. Pour cette raison, le développement d'un silo expérimental pouvant être utilisé avec du matériel sec et réhydraté est souhaitable. Le but de ce projet est donc de développer un tel silo.

Les essais ont été réalisés avec les deux espèces végétales les plus cultivées au Québec, soit la fléole des prés (*Phleum pratense* L.) et la luzerne (*Medicago sativa* L.). Celles-ci ont été récoltées à partir des essais de plantes fourragères de la ferme de recherche de l'Université de Guelph à New-Liskeard. Le matériel végétal a été déshydraté de trois façons : 1) 50 °C pendant 48 heures; 2) 50 °C pendant 72 heures; 3) par lyophilisation. Le séchage par lyophilisation a permis une meilleure conservation des sucres et a permis de minimiser la dégradation des protéines. Un traitement par irradiation gamma a été nécessaire pour éliminer les microorganismes qui n'avaient pas été détruits lors de la déshydratation par lyophilisation.

Les silos ont été préparés dans des sacs de polyéthylène à l'intérieur desquels le matériel végétal introduit avait, au préalable, été réhydraté et inoculé avec des bactéries lactiques avant d'y appliquer un vide et de les sceller. Trois niveaux de pression négative ont été testés afin de vérifier si l'intensité du vide avait un effet sur la fermentation, tel que mesuré par le pH. L'application d'un niveau de vide -90 kPa pendant 40 secondes a été choisie en raison de la meilleure répétitivité d'une série de silos, tel qu'évalué par le coefficient de variation des traitements.

L'étude de la cinétique d'une souche bactérienne inefficace en fermentation lactique et d'une souche efficace a permis de faire la démonstration que ce type de silo peut être utilisé pour faire un premier tamisage des souches dans un programme de sélection pour trouver des bactéries lactiques efficaces. Avec ce type de silo, il a été possible d'évaluer le temps de latence et le taux de diminution du pH, deux critères importants pour évaluer l'efficacité des souches. Il est donc possible, par la suite, de tester seulement les bactéries jugées efficaces diminuant ainsi les besoins en ressources pour des études de compétition avec la flore épiphyte.

Mots clés : silos expérimentaux, ensilage, bactéries lactiques, sachets plastiques

CHAPITRE I

PROBLÉMATIQUE

Les fourrages représentent 40-90 % de la diète des ruminants (Lafrenière et Berthiaume, 2005). Sous nos latitudes, les producteurs agricoles doivent donc récolter et conserver ces aliments pour la période hivernale d'alimentation. Cette conservation se fait principalement sous forme d'ensilage (Lafrenière et Berthiaume, 2005). L'ensilage est une technique de conservation des fourrages par fermentation acide. Le processus de fermentation doit être dominé par les bactéries lactiques qui transforment les sucres solubles de la plante en acide organique, principalement l'acide lactique, permettant ainsi une acidification rapide du milieu et le contrôle des populations microbiennes indésirables. Ce processus devrait donc permettre de conserver les éléments nutritifs des fourrages. L'obtention d'un ensilage bien conservé dépend de nombreux facteurs dont l'ensilabilité de la plante et des populations de microorganismes présents sur la plante lors de la mise en silo. L'ensilabilité est déterminée par les caractéristiques biochimiques de la plante dont le pouvoir tampon, les sucres solubles et le contenu en matière sèche. Il est possible d'augmenter l'ensilabilité en élevant la teneur en matière sèche des fourrages par le préfanage (Lafrenière, 2002). Cela n'est toutefois pas toujours possible et donne lieu à des ensilages avec des profils fermentaires indésirables tels que les profils butyriques. Ces profils sont néfastes pour la productivité animale et peuvent aussi avoir un effet négatif en production fromagère lorsque les spores butyriques contaminent le lait cru. Selon certaines études européennes, lorsque les vaches laitières sont nourries avec un ensilage contenant plus de 1 000 spores butyriques par gramme augmente de façon importante le risque de contamination du lait lors de la traite. Les spores butyriques sont résistantes à la pasteurisation ce qui peut causer des problèmes de gonflement lors de la maturation de certains types de fromage (Demarquilly, 1998).

Les profils fermentaires butyriques dans les ensilages de graminées seraient de plus en plus fréquents en raison de la diminution de la fertilisation azotée. Selon Weissbach (1996), les inoculants lactiques pourraient résoudre ce problème. Toutefois, ceux-ci doivent être efficaces à des teneurs en matière sèche pouvant atteindre 45 %. Pour avoir plus

d'information sur l'efficacité de nouvelles souches pouvant être utilisées en tant qu'inoculant, plusieurs bactéries lactiques doivent être testées. L'utilisation d'un grand nombre de silos expérimentaux à l'échelle du laboratoire est nécessaire. Johnson *et al.* (2005) ont développé une méthode utilisant des sacs de polyéthylène dans lesquels l'air est évacué sous vide pour compacter le matériel et obtenir les conditions anaérobies retrouvées dans les silos. L'utilisation de ces silos expérimentaux est cependant limitative puisque l'ensilabilité des plantes et la diversité des microorganismes se modifient selon les conditions environnementales tout au long de la saison de végétation (Lafrenière 2002). Récemment, Harman *et al.* (2002) ont développé une technique utilisant des plaques de culture cellulaire pour tester l'osmotolérance des souches de bactéries lactiques avec du matériel sec. Toutefois, des tests préliminaires réalisés en utilisant cette méthode dans les laboratoires de l'URDAAT ont démontré que les microorganismes ayant survécu à la déshydratation du matériel végétal peuvent interférer avec la fermentation lactique (Drouin, communication personnelle). De plus, les quantités d'ensilage pouvant être utilisées avec les plaques de culture de cellules ne permettent pas la caractérisation des profils de fermentation autre que la détermination du pH. D'autres paramètres fermentaires tels que l'acide butyrique et l'azote ammoniacal sont nécessaires pour attester qu'il y a eu fermentation butyrique (Lafrenière et Berthiaume 2005).

HYPOTHÈSE

Il est possible de produire un ensilage avec un silo expérimental de laboratoire fabriqué à partir de plantes fourragères séchées puis réhydratées. Ce silo permet de discriminer les souches efficaces de celles non efficaces.

Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, les objectifs du projet étaient les suivants :

- Définir les conditions de séchage du matériel végétal permettant de conserver le maximum des caractéristiques biochimiques de la plante.
- Déterminer les paramètres de fabrication des silos pour assurer la répétabilité de la méthode.
- Tester le modèle avec une souche de bactéries lactiques efficaces et une autre non efficace.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1. L'ensilage

Les fourrages représentent 40-90 % de la diète des ruminants (Lafrenière et Berthiaume, 2005). Étant donné les conditions climatiques hivernales sous nos latitudes, les éleveurs doivent récolter et conserver cet aliment sous forme d'ensilage. L'ensilage est une technique de conservation des fourrages par tassement et fermentation acide connue depuis l'antiquité (Paragon, 2004).

Récemment, Weinberg et Muck (1996) ainsi que Merry *et al.* (1997) ont divisé le processus d'ensilement en quatre étapes : [1] une phase aérobie caractérisée par la poursuite de l'activité enzymatique de la plante et la prolifération des microorganismes aérobies; [2] une phase de fermentation où la domination des bactéries lactiques devrait permettre d'inhiber et/ou de limiter la croissance des autres microorganismes; [3] une phase de stabilité anaérobie où l'activité microbienne est minimale si les conditions d'étanchéité sont maintenues et [4] une phase d'alimentation où l'ouverture du silo permet de nouveau la croissance des microorganismes aérobies.

2.1.1. Phase aérobie

La phase aérobie débute au moment de la fauche de la plante et se poursuit jusqu'à l'épuisement de l'oxygène dans le silo. Durant cette phase, plusieurs processus enzymatiques se poursuivent dont la respiration et la protéolyse. La respiration est la réaction métabolique qui oxyde les sucres en gaz carbonique (CO₂) et en eau tout en produisant de l'énergie sous

fermentation. D'autre part, cela permet d'éliminer l'oxygène emprisonné dans le matériel végétal. La protéolyse est l'hydrolyse des protéines par les protéases de la plante. Cette activité a pour effet de les solubiliser en chaînes plus ou moins longues (peptides) et en acides aminés libres.

Toujours lors de cette phase, les microorganismes aérobies stricts et facultatifs se développent avec plus ou moins d'intensité selon la température et l'humidité, tant que les conditions aérobies sont maintenues. La phase aérobie doit donc être de courte durée pour conserver le maximum de sucres pour les bactéries lactiques responsables de la fermentation.

2.1.2. Phase de fermentation

La phase de fermentation débute lorsque les conditions anaérobies sont atteintes. Chez la plante, ces conditions provoquent l'éclatement des cellules. Ceci augmente la disponibilité des sucres solubles pour les microorganismes dont seulement une partie avait été rendue disponible lors du traitement mécanique des fourrages (hachage, lacération ou macération).

Ce sont les microorganismes anaérobies facultatifs et stricts qui peuvent maintenant se développer dont les bactéries lactiques, les entérobactéries, les bactéries butyriques et les levures (McDonald *et al.*, 1991). Pour les bactéries lactiques, une population d'environ 10^8 UFC (unité formant des colonies) g^{-1} fourrage frais (FF) doit être atteinte avant que le pH commence à descendre (Jaster, 1995). Si les bactéries lactiques sont homofermentaires, elles produisent seulement de l'acide lactique permettant d'abaisser rapidement le pH. Par contre, si les bactéries lactiques sont hétérofermentaires, il y a aussi production d'acide acétique, de mannitol, d'éthanol et de CO_2 , ce qui fait que le pH descend moins rapidement parce que le pKa de l'acide acétique est plus élevé que celui de l'acide lactique (McDonald *et al.*, 1991). Les entérobactéries sont anaérobies facultatives. Elles sont inhibées par la diminution du pH lorsque celui-ci atteint 4,5 ou moins. Pour inhiber les bactéries butyriques, il faudra un pH de 4,3 ou moins. Toutefois, le pH qui inhibe les bactéries butyriques varie en fonction de la teneur en matière sèche du matériel ensilé. Plus la matière sèche est élevée, plus le pH pour inhiber les bactéries butyriques est élevé (Wieringa, 1969). Toutefois, des résultats plus

récents ont permis de démontrer que les teneurs en nitrates des végétaux sont aussi un facteur important du développement des bactéries butyriques (Kaiser *et al.*, 2002). La présence de nitrate permet, suite à sa réduction en nitrite, d'empêcher la croissance des clostridies. Quant aux levures, elles sont peu sensibles au pH atteint durant l'ensilage et la plupart pourront se développer entre un pH de 3 et 8. De plus, elles sont plus résistantes à l'augmentation de la pression osmotique que les bactéries lactiques. Cette caractéristique leur confère un avantage écologique dans les ensilages dont la teneur en matière sèche est élevée. Dans ces conditions, il est même possible d'observer une fermentation éthanolique (Driehuis et van Wijkelaar, 1996).

2.1.3. Phase de stabilité anaérobie

La phase de stabilité anaérobie est caractérisée par une faible activité microbienne si le silo est étanche à l'oxygène et que le pH est descendu suffisamment bas pour inhiber le développement des spores butyriques. C'est pourquoi cette phase est appelée phase de stabilité anaérobie. Si le pH de stabilité anaérobie n'a pas été atteint, les bactéries butyriques saccharolytiques se développeront en utilisant l'acide lactique pour produire de l'acide butyrique et le pH augmentera. Avec un pH plus élevé, les bactéries butyriques protéolytiques seront plus actives et il y aura fermentation des acides aminés. Cela se traduira par une augmentation de l'azote ammoniacal et par la production d'amines. Il peut aussi y avoir production d'acide acétique et d'acide propionique. Durant cette phase de l'ensilage, le développement des levures est possible puisque le pH ne permet pas d'inhiber le développement de ces microorganismes. Leur développement varie en fonction du pH, des types et des teneurs en acides organiques de même que les conditions d'étanchéité du silo (Lafrenière et Berthiaume, 2005).

2.1.4. Phase d'alimentation

Durant la phase d'alimentation, une partie plus ou moins importante du silo est exposée à la présence d'oxygène. Selon les conditions environnementales, les microorganismes aérobies

pourront se développer de nouveau. Avec la croissance de ces microorganismes est associée une augmentation de la température du matériel ensilé. L'intervalle de temps entre l'ouverture du silo et l'augmentation de température est appelé la période de stabilité aérobie.

2.2. Caractéristiques biochimiques des plantes

2.2.1 Protéines

Les fourrages sont des aliments pour les ruminants. Ils contiennent des substances nutritives qui sont utilisées pour subvenir à leurs besoins. La teneur en protéines des fourrages frais représente 75 à 90 % de son contenu en azote total. Les peptides, les acides aminés libres, les amides, les uréides, les nucléotides, la chlorophylle et les nitrates constituent l'autre portion de l'azote (McDonald *et al.*, 1991). Les protéines végétales sont caractérisées par une prédominance de protéine soluble telle la Rubisco, qui constitue environ 50 % du total des protéines. L'état des protéines pourrait donc être utilisé comme un bon indicateur servant à déterminer la qualité de l'ensilage (Davies *et al.*, 1998).

Suite à la fauche, une dégradation des protéines a lieu. Cette réaction physiologique de la plante est appelée la protéolyse. Le niveau de protéolyse varie selon l'espèce végétale (Papadopoulos et McKersie, 1983), le niveau de matière sèche et la température ambiante lors de la mise en silo (McDonald *et al.*, 1991). Lors du processus de séchage du fourrage, il y a peu de changement au niveau protéique. La majorité de l'azote présent dans le fourrage demeure sous forme protéique si les conditions de préfanage sont bonnes (Tremblay *et al.*, 2005).

Le phénomène de protéolyse s'observe surtout lors du processus de fermentation du fourrage en ensilage plutôt que lors d'un préfanage (Tremblay *et al.*, 2005). La dégradabilité de la protéine diminue parallèlement avec une augmentation de la teneur en matière sèche de l'ensilage parce que la fermentation est moins intense dans le silo (Tremblay *et al.*, 2005). Aussi, plus la production d'acide lactique est rapide, plus l'intensité de la protéolyse est

réduite, en particulier dans les fourrages à niveau élevé de sucres solubles. Une teneur élevée en sucres offre un avantage remarquable pour les silos inoculés (Cussen *et al.*, 1995).

2.2.2. Les sucres de la plante

La grande majorité de l'énergie des fourrages provient des hydrates de carbone. Les hydrates de carbone ou sucres peuvent être séparés en deux principaux groupes : les sucres structuraux qui composent les parois cellulaires et les sucres non structuraux qui sont contenus à l'intérieur des cellules. Les sucres structuraux sont pour la plupart des sucres complexes appelés polysaccharides. Ils sont divisés en trois grands groupes : les substances pectiques, l'hémicellulose et la cellulose. Pour que ceux-ci puissent être utilisés par les bactéries lactiques, ils doivent être hydrolysés en monosaccharides. Selon McDonald *et al.* (1991), l'arabinose et le xylose provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses pourraient être utilisés par les bactéries lactiques puisque les hémicellulases de la plante sont libérées dès que la plante est coupée. Parmi les sucres non structuraux, on retrouve le glucose, le fructose, le sucrose et des polysaccharides tels que l'amidon et les fructans. Ces derniers sont des sucres d'entreposage (McDonald *et al.*, 1991). Chez les graminées, les sucres d'entreposage sont les fructans. Chez les légumineuses, le sucre d'entreposage est l'amidon. Ce dernier n'est pas disponible pour le processus de fermentation puisque l'amidon doit être hydrolysé de façon enzymatique pour rendre les sucres disponibles. D'autres sucres, en concentrations minimales, ont aussi été identifiés chez les graminées et les légumineuses. Le glucose et le fructose se retrouvent en quantité variant de 1-3 % de la matière sèche. Idéalement, la plante devrait contenir une teneur en sucres solubles de 10 % de la matière sèche pour assurer une bonne fermentation (Savoie *et al.*, 1998). La luzerne contient une faible teneur en sucres solubles en comparaison avec les graminées et le trèfle rouge (Owens *et al.*, 1999b). Les concentrations en sucres sont influencées par l'espèce végétale, la température (Tremblay *et al.*, 2005), le contenu en matière sèche et d'autres facteurs. Les sucres solubles diminuent durant le préfanage à cause de la respiration qui se poursuit (Berthiaume *et al.*, 1998). Cette respiration représente une perte de glucides rapidement disponibles qui sont essentiellement digestibles à 100 % (Tremblay *et al.*, 2005). Au cours du processus de fermentation, une partie des sucres

solubles sont transformés en acides organiques par les microorganismes présents sur la plante au moment de la récolte (Tremblay *et al.*, 2005). Aussi, une teneur en matière sèche élevée réduit le développement des microorganismes lactiques. La production d'acide lactique est faible. Dans ces conditions, les sucres solubles résiduels sont élevés et deviennent un substrat pour les levures et les moisissures pouvant causer des problèmes de stabilité aérobie lors de l'ouverture des silos ou lorsqu'il y a manque d'étanchéité (Savoie et Tremblay, 1998).

2.2.3. Le pouvoir tampon

Le pouvoir tampon d'une plante est la capacité à résister aux changements du pH. La majeure partie du pouvoir tampon est attribuée à la présence d'anions sous forme de sels d'acides organiques, d'ortho-phosphates, de sulfates, de nitrates et de chlorures, et seulement une proportion variant entre 10-20 % provient des protéines (McDonald *et al.*, 1991). Le pouvoir tampon de la luzerne est typiquement plus élevé que celui des graminées (Buxton et O'Kiely, 2003). Ainsi, le déclin du pH de la luzerne n'est souvent pas aussi rapide comparé avec les graminées ou les autres légumineuses (Owens *et al.*, 1999a). La fertilisation azotée exerce aussi un effet variable sur le pouvoir tampon. Une augmentation de l'azote dans la plante accroît son pouvoir tampon (Keady et O'Kiely, 1996), tandis qu'une déficience en azote le réduit (McDonald et Henderson, 1962). Pendant la phase du séchage pour les fourrages qui ne sont pas ensilés directement, une proportion d'acides organiques est dégradée, ce qui réduit le pouvoir tampon de la plante. Pour les fourrages qui subissent un préfanage avant leur ensilement, une proportion des acides organiques est dégradée, ce qui réduit le pouvoir tampon (McDonald *et al.* 1991).

2.3. Silos expérimentaux

L'utilisation de silos expérimentaux nous permet de mieux contrôler l'ensilage produit et d'être en mesure de mieux discriminer les traitements avec un nombre limité de silos. Ils se subdivisent en deux catégories : les silos expérimentaux pilotes et les silos expérimentaux de laboratoire (Cherney et Cherney, 2003). Les silos expérimentaux pilotes sont utilisés pour des

essais avec de grandes quantités de matériel végétal, généralement de 100 kg à 1000 kg. Les silos de laboratoire, généralement d'une capacité de 50 g à quelques kilogrammes, sont utilisés d'une façon intensive pour fournir plus d'informations nécessaires et utiles pour la confection et l'étude des silos de production (Johnson *et al.*, 2005).

Les silos expérimentaux de laboratoire sont fabriqués à partir de matériaux variés (Cherney et Cherney, 2003). O'Kiely et Wilson (1991) ont décrit un genre de silo qui possède toutes les caractéristiques désirées pour un silo de laboratoire. Il doit être de forme cylindrique et muni de valves conçues pour le relâchement des gaz et l'évacuation des effluents. À partir de ces recommandations, des silos de laboratoire en plastique et de forme cylindrique ont été développés en particulier pour évaluer l'effet de la densité et les effluents (O'Donnell *et al.*, 1997).

Malgré les avantages offerts par l'utilisation des silos de laboratoire, certains inconvénients ont été identifiés. Le maintien des conditions anaérobies et l'obtention d'une densité élevée du matériel végétal à ensiler sont parmi les critères essentiels pour la conception d'un silo.

Les sacs en polyéthylène à volume flexible sont avantageux par rapport aux tubes en verre à volume fixe. Ohmomo *et al.*, (2002) ont effectué une comparaison entre des silos en tubes de verre et des silos en sacs de polyéthylène emballés sous vide. Les silos en sachets de polyéthylène ont offert plus d'avantages que ceux en tubes de verre. Voici quelques avantages offerts par les sachets :

- La reproductibilité de la technique;
- La stérilisation du matériel;
- Le contrôle de la flore microbienne;
- La densité du matériel végétal, la rapidité du travail.

Johnson *et al.* (2005) ont pu déterminer l'utilité de la pression négative (sous vide) en comparant les résultats obtenus dans des silos construits à partir de sacs en polyéthylène avec ceux en tubes de verre. Ils ont ainsi pu identifier les avantages de cette technique en relation avec différents opérateurs et ils ont conclu que l'utilisation des sacs en polyéthylène est une

alternative pratique, flexible et rentable. La technique est reproductible car favorisée par la grande uniformité du matériel.

Récemment, Harman et collaborateurs (2002) ont développé une méthode utilisant du matériel végétal séché et réhydraté pour atteindre la teneur en matière sèche désirée afin de vérifier l'efficacité de souches de bactéries lactiques en utilisant des plaques de culture de cellules multipuits. Voici les avantages et les inconvénients reliés à cette technique :

Avantages :

- Permet des essais à n'importe quelle période de l'année.
- Meilleure évaluation de l'osmotolérance des bactéries lactiques que les méthodes en milieu liquide avec KCl.
- Plus facile de modifier l'ensilabilité du matériel végétal et les conditions environnementales comme la température et la teneur en matière sèche.
- Nécessite peu de main-d'œuvre lors de la fabrication des silos.
- Nécessite peu d'espace d'entreposage.
- Plusieurs souches peuvent être testées sous les mêmes conditions d'ensilabilité.

Inconvénients:

- Peu de matériel végétal pour mesurer d'autres paramètres de fermentation autre que le pH.
- Ne tiens pas compte des populations épiphytes sur le matériel végétal.
- En travaillant avec du matériel végétal déshydraté, il faut s'assurer que la technique de séchage utilisé ait le moins d'impact possible en comparaison avec le matériel végétal vert, principalement en ce qui a trait à la conservation d'un maximum de sucres solubles et du pouvoir tampon.

Par ailleurs, le séchage devrait éliminer la majorité des microorganismes épiphytes en lien avec la diminution de l'activité de l'eau (a_w). La prolifération des bactéries sporulées pourrait être fortement inhibée par le séchage à 60 % de teneur en eau (Ohmomo *et al.*, 2002). Ces conditions de séchage tendent à augmenter le nombre des entérobactéries (Müller *et al.*,

1993) et n'ont pas d'effet sur les levures. Elles favorisent par contre le développement des bactéries lactiques si la teneur en eau est située entre 50-70 % et, selon le type de silo (Savoie et Tremblay, 1998). Ces bactéries sont plus tolérantes à des concentrations faibles en eau que les bactéries indésirables (butyriques) (Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs 2004). Dans le cas des moisissures, c'est l'absence d'O₂ qui permettra de diminuer cette population (Lafrenière et Berthiaume, 2000).

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Effet des modes de séchage sur les caractéristiques biochimiques et microbiologiques du matériel végétal

3.1.1. Méthode de séchage et préparation du matériel végétal

De la luzerne (*Medicago sativa* L.), cultivar Magnum IV, et de la fléole des prés (*Phleum pratense* L.), cultivar Climax, ont été récoltées à partir des parcelles du site de la station agronomique de l'Université de Guelph à New-Liskeard, en Ontario (Figure 1-2). Ces parcelles ont été implantées sur un loam argileux de pH 7,1 ayant une concentration en phosphore (P_2O_5) de 76 kg P ha⁻¹ et en potassium (K_2O) de 368 kg K ha⁻¹. La fléole des prés a reçu une fertilisation minérale de 50 kg de N ha⁻¹ sous forme de NH_4NO_3 . Le matériel récolté de chacune des parcelles a été divisé en quatre sous-échantillons selon les traitements suivants : sans séchage et congelé à -20°C (vert); 50° C au four pendant 48 heures avec ventilation forcée; 50° C au four pendant 72 heures avec ventilation forcée; lyophilisation (Virtis Ultra) pendant une période de 120 heures. Le matériel séché a été ensuite moulu par un broyeur Wiley (Standard model 3, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA) muni d'un tamis de 8 mm. Pour le dosage des sucres solubles, un sous-échantillon a été prélevé et moulu de nouveau au broyeur Wiley muni d'un tamis de 1 mm. Un sous-échantillon moulu à 8 mm de chaque traitement a été séché à 105° C pendant 24 heures (Mertens 1992) pour déterminer la teneur en matière sèche exacte du matériel végétal à réhydrater lors des essais subséquents.



Figure 1 : Représentation de la luzerne (*Medicago sativa* L.), une légumineuse fourragère.



Figure 2: Représentation de la fléole (*Phleum pratense* L.), une graminée fourragère.

3.1.2. Mesure des caractéristiques biochimiques

3.1.2.1. Évaluation de la dégradation de la qualité des protéines

L'extraction des protéines solubles a été effectuée sur le matériel sec pour les trois traitements de séchage de même que sur le matériel vert, selon la méthode de Fairbairn *et al.* (1988) et modifiée par Grum *et al.* (1991). Pour les échantillons secs, 1 g de matériel végétal a été suspendu dans 10 ml de tampon d'extraction (HEPES 0,1 M, sucrose 0,5 M, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 6 mM, acide ascorbique 0,075 mM, $Na_2S_2O_5$ 7 mM, et EDTA 3 mM ajusté au pH 7,4 avec NaOH 50 %), additionné de 0,2 ml phényl-méthyl-sulpho-fluoride 1 mM dissous dans l'éthanol à 95 %, de 0,01 g polyvinylpyrrolidone et de 0,02 ml 2-mercaptoéthanol. Ce mélange a été agité pendant 2 heures à 300 rpm à température ambiante puis centrifugé à 12 000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant a été décanté et filtré sur papier Watman de 0,45 μm (Millipore Bedford). L'extraction des protéines du matériel vert congelé a été modifiée par rapport au matériel sec. Une quantité de 7 g de matériel végétal a été suspendue dans 70 ml de la solution tampon pour l'extraction, additionnée de 1,4 ml de phényl-méthyl-sulpho-fluoride, de 2,1 ml de mercaptoéthanol et de 7 g de polyvinyl-polypyrrolidone. Cette solution a ensuite subi un traitement mécanique en utilisant un mélangeur « Waring Blender » pour broyer le matériel végétal. La solution a ensuite été filtrée à l'aide de coton à fromage après l'avoir conservée à 4° C pendant deux heures. Ce filtrat a été centrifugé à 2 500 x g pendant 20 minutes à 4° C. Pour les deux types de matériel végétal, les extraits ont été additionnés de bleu de bromophénol à 0,05 % pour la coloration. La concentration en protéines a été évaluée d'après la technique de Bradford en utilisant le kit D_C Protein Assay (Bio-Rad).

L'évaluation qualitative des protéines a été effectuée par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970) à l'aide d'un appareil Mini-Protean II (Bio-Rad). Une aliquote de 20 μl de chaque extraction a été diluée dans un volume identique de tampon d'électrophorèse 2X (Tris 0,125 M, SDS 4 %, glycérol 20 % et 2-mercaptoéthanol 10 %). Pour chaque échantillon, un volume représentant 10 μg de protéines ml^{-1} a été déposé sur le gel. Une échelle de poids moléculaire Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad) a été déposée dans

les puits adjacents aux échantillons. L'électrophorèse a été effectuée sur un gel d'acrylamide prémoulé Ready Gel Tris-HCl (Bio-Rad) formé d'un gradient de 4-20 % de concentration d'acrylamide. Le tampon d'électrophorèse utilisé était le 10X TGS (Bio-Rad) composé de 0,25 M Tris, 0,192 M de glycine et 0,1 % SDS. La migration a été effectuée sous une tension de 100 volts pendant deux heures. Les protéines ont été révélées suite à une coloration au Bleu de Coomassie R-250 0,1 % (p/v) et fixées à la matrice dans une solution d'acide acétique : méthanol : H₂O (10 : 8 : 2) avant décoloration de la matrice par une solution d'acide acétique : méthanol : H₂O (1 : 1 : 8). L'observation qualitative de la dégradation des protéines qu'aurait pu provoquer chaque mode de séchage a été effectuée par comparaison qualitative des densités pour l'ensemble des bandes avec les patrons de migration du matériel vert à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad).

L'azote total a été évalué sur un échantillon sec de 1 g selon la méthode 7,022 de l'Association des Chimistes Analytiques (AOAC). L'azote insoluble a été déterminé par Kjeldahl après précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique (TCA) (10 % p/v dans l'eau) (Licitra *et al.*, 1996). L'azote soluble a été calculé en soustrayant la proportion d'azote insoluble de 100 %. Les teneurs en nitrate des plantes ont été quantifiées par nitration à l'acide salicylique (Cataldo *et al.* 1975).

3.1.2.2. Dosage des sucres solubles

L'extraction des sucres solubles a été faite dans 25 mL d'eau avec une quantité de 0,1 g de matériel sec moulu à 1 mm pendant une heure d'agitation à la température de la pièce. Cette suspension a été filtrée par succion en utilisant un papier-filtre Whatman 541. L'extrait a ensuite été acidifié avec du H₂SO₄ 0,1N. Les sucres ont été dosés par colorimétrie en utilisant la méthode au phénol/acide sulfurique de Dubois *et al.* (1956).

3.1.2.3. Mesure du pouvoir tampon

Le pouvoir tampon a été évalué sur le matériel sec et broyé à 1 mm utilisant la méthode de Weissbach *et al.* (1974). Un gramme d'échantillon a été mélangé avec 100 ml d'eau déionisée dans un bécher à température ambiante. Après agitation, le pH a été abaissé à 4,0 avec une solution d'acide lactique 0,1 N. Les milliéquivalents d'acide lactique ont été convertis en grammes d'acide lactique kg^{-1} de matière sèche (MS).

3.1.3. Survie des différents groupes de microorganismes à la déshydratation

Les dénombrements ont été faits avec des échantillons séchés des deux espèces de plantes fourragères soit la luzerne et la fléole des prés. Pour chaque échantillon, une quantité de 10 g a été prélevée de façon aseptique. Celle-ci a été mélangée à 90 ml d'eau peptonée stérile ($2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Bacto-peptone et $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ de Tween 80) puis agitée pendant deux minutes dans un Stomacher (Steward, Grande-Bretagne). À partir de cette suspension, une série de dilutions 1:10 a été faite dans de l'eau peptonée stérile ($2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Bacto-peptone). L'inoculation des milieux gélosés a été effectuée en triplicata en utilisant la technique d'étalement sur gélose. Les populations de bactéries lactiques ont été isolées sur milieux gélosés de De Man, Rogosa et Sharp (MRS) (Bacto) et Rogosa (Oxoid), tous deux additionnés de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de cycloheximide (Sigma). Les populations d'entérobactéries ont été isolées sur milieu Violet Red bile glucose agar (VRBGA) (Oxoid), les levures et moisissures sur un milieu Malt extract agar (MEA) (Difco) avec addition de 100 mg L^{-1} de streptomycine (Sigma) et de 50 mg L^{-1} de néomycine (Sigma) avec un ajustement du pH à 5,0. Les *Bacillus* et *Clostridium* ont été isolés sur le milieu Reinforced Clostridial Agar (RCA) (Oxoid) additionné de Rouge neutre à 0,005 % (p/v) et de cyclosérine (Sigma) à 200 mg L^{-1} (Jonsson, 1990).

3.1.4. Analyses statistiques

La dégradation des protéines par électrophorèse a été déterminée par une évaluation qualitative en comparaison avec une échelle de poids moléculaire. Pour les autres variables à analyser, un arrangement de trois traitements (méthodes de séchage) en blocs aléatoires complets répétés quatre fois a été utilisé (même dispositif expérimental que celui au champ) à l'exception des concentrations en protéines évaluées par Bradford où quatre traitements (vert et les trois méthodes de séchage) ont été utilisés. La normalité des données et l'analyse graphique des résidus ont été réalisées avec la procédure Shapiro-Wilk de JMP (SAS Institute, 2003). Les données ont été analysées avec la procédure GLM de JMP (SAS Institute, 2003) où les méthodes de séchage et le matériel vert ont été considérés comme des facteurs fixes alors que les répétitions ont été considérées aléatoires. Pour les autres caractéristiques biochimiques et les dénombrements bactériens, les moyennes ont été comparées en utilisant le test de Tukey avec un seuil de $\alpha = 0,05$. Les deux espèces végétales ont été analysées séparément.

3.2. Évaluation de la technique des silos par un essai de répétitivité

3.2.1. Préparation et inoculation des silos

Du matériel végétal de fléole des prés et de luzerne déshydraté par lyophilisation et broyé à 8 mm, tel que décrit à la section précédente, a été utilisé. Ce matériel végétal a subi une irradiation avec une dose de 10 KGy administrée pendant 120 minutes au Centre de Recherche sur les Aliments d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à St-Hyacinthe. Les silos ont été fabriqués avec des sacs de polyéthylène Whirl Pack stériles (Figure 3). Le matériel végétal a été réhydraté avec de l'eau distillée stérile pour atteindre une teneur en matière sèche de 25 %. L'équation suivante a été utilisée pour déterminer la quantité d'eau à ajouter :

$$\begin{aligned} & (\text{Masse du matériel séché}) \times (\% \text{ MS corrigée à } 105^{\circ} \text{ C}) = \\ & (\text{Masse du matériel réhydraté}) \times (\% \text{ MS finale recherchée}) \end{aligned}$$

Ainsi, la masse du matériel réhydraté correspond à la somme de la masse du matériel sec plus la quantité d'eau à ajouter. La teneur en matière sèche à 105° C pour la fléole des prés était de 93,8 % et de 93,0 % pour la luzerne. Le poids du matériel séché utilisé pour les deux espèces a été de 50 g, ce qui a nécessité un volume d'eau distillée stérile de 187,6 ml pour l'obtention d'une matière sèche de 25 %. Les silos ont été inoculés avec une bactérie lactique efficace (*Pediococcus pentosaceus* IA-38, Lallemand Animal Nutrition), avec une dose de 10⁶ UFC (Unité formant des colonies) g⁻¹ fourrage frais (FF). Cet inoculant a été ajouté à l'eau de réhydratation pour ne pas modifier la teneur en matière sèche. Au préalable, le nombre de bactéries avait été standardisé par densité optique (DO₆₀₀). Une fois les silos remplis, un vide a été effectué (Figure 4) avant de les sceller à l'aide d'un appareil commercial (HI-TECH Vacuum-Nel) (Figure 5). Trois traitements de pression négative (vacuum) ont été testés, soit 5, 40 et 85 secondes avec une pression négative de -90 kPa. Les silos ont été incubés à 25° C pendant 20 jours.

3.2.2 Détermination du pH des ensilages

Le pH a été évalué en prélevant dix grammes d'échantillon dans un bécher auquel 20 ml d'eau distillée déionisée ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été agité avec une spatule pendant 10 minutes pour permettre la réhydratation du matériel avant d'insérer l'électrode du pH-mètre.

3.2.3. Analyses statistiques

L'évaluation de la répétitivité de la fabrication des silos a été faite avec le pH. Pour chaque espèce végétale et chacun des niveaux de vide, dix silos ont été fabriqués. La répétitivité des silos pour chaque combinaison temps en pression négative x espèce végétale a été évaluée en utilisant les statistiques descriptives de l'erreur standard et le coefficient de variation.



Figure 3: Silo en sachet de polyéthylène après le scellage sous vide.

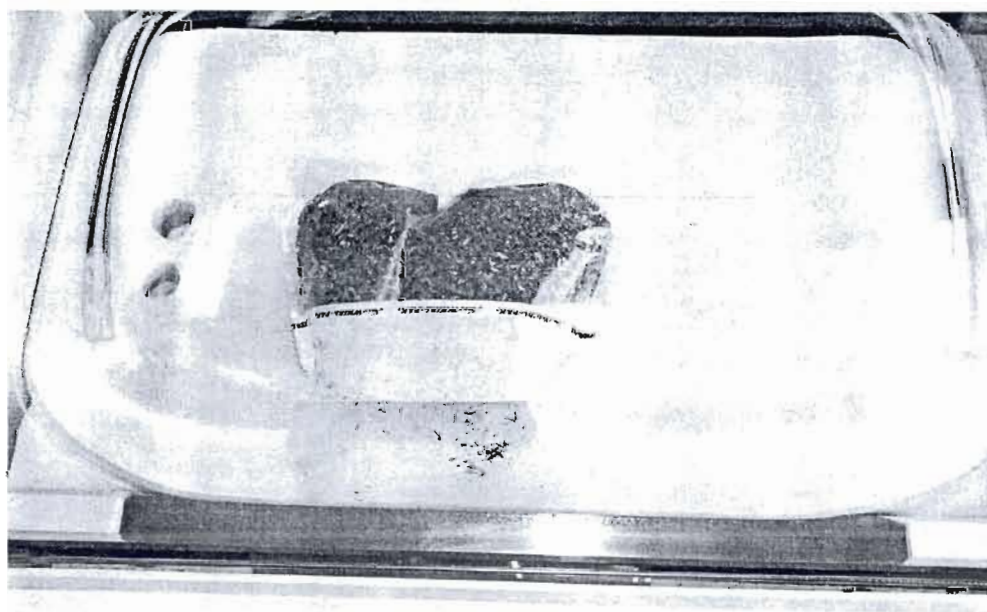


Figure 4: Silo en sachet de polyéthylène durant la formation du vide

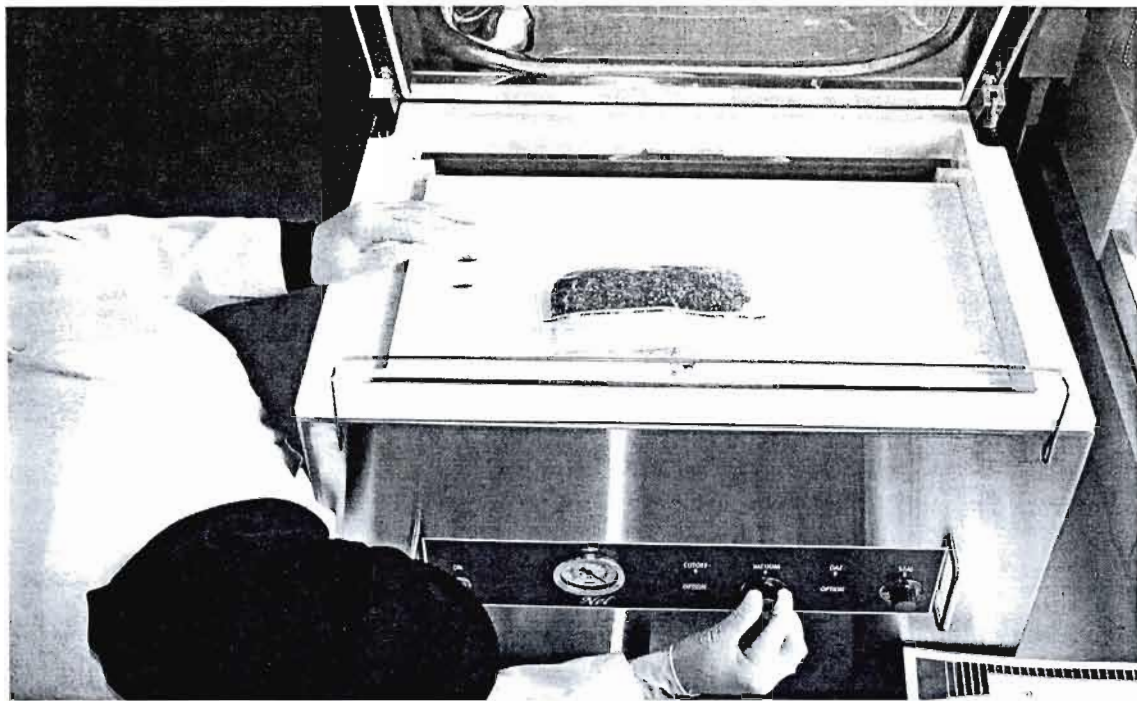


Figure 5: Appareil HI-TECH Vacuum-Nel utilisé pour le scellage sous vide des silos.

3.3 Utilisation de la technique des silos expérimentaux pour évaluer l'efficacité des bactéries lactiques

3.3.1 Préparation et ouverture des silos expérimentaux

La luzerne et la fléole des prés ont été préparées tel que décrit à la section 3.2.1. Le matériel a ensuite été réhydraté pour obtenir une teneur en matière sèche de 35 % tel que décrit précédemment à la section 3.2 en utilisant la valeur de MS corrigée à 105° C. Une quantité de 40 g a été introduite dans les sacs de polyéthylène Whirl Pack stériles. Les silos ont été inoculés avec deux souches de bactéries lactiques, soit une souche efficace (*Pediococcus pentosaceus* 1A-38, Lallemend Animal Nutrition) et une souche non efficace (*Lactobacillus acidophilus* GIA-15, Lallemend Animal Nutrition). L'inoculation a été effectuée après avoir procédé aux pesées du matériel végétal sec. L'inoculant a été mélangé avec l'eau de réhydratation pour ne pas modifier la teneur en matière sèche désirée (35 %). Le nombre de cellules de chacune des souches a été standardisé par densité optique (DO₆₀₀) afin d'obtenir 10⁶ UFC g⁻¹ FF. Des silos ont été ouverts après 0, 1, 2, 4, 8, 16, et 32 jours afin de suivre la cinétique du pH et le dénombrement des souches inoculées. L'incubation a été effectuée dans une chambre de croissance E15 (Convion, inc.) à une température de 25° C.

3.3.2 Analyses biochimiques

Les concentrations en sucres solubles, en azote total ainsi que le pouvoir tampon ont été quantifiés selon les méthodes décrites à la section 3.1.2. Les dénombrements des bactéries lactiques ont été faits sur milieux Rogosa (Oxoid) et MRS (Bacto), tel que décrits à la section 3.1.4. Les dénombrements bactériens ont été effectués à toutes les ouvertures de silos, tel que décrit à la section 3.1.4. Les paramètres mesurés au jour 32 ont été le pH, les acides gras volatils (l'acide acétique, propionique, l'éthanol, valérique et l'acide iso-butyrique et n-butyrique), l'azote ammoniacal et l'acide lactique. Le relevé des pH des silos a été effectué de la même façon que pour l'essai précédent à la section 3.2.2. Pour le dosage des acides gras volatils (AGV) ainsi que celui de l'azote ammoniacal (N-NH₃), 20 g d'ensilage ont été

mélangés avec 200 ml de HCl 0,1 N dans une bouteille de 250 ml de Corning au réfrigérateur à une température de 4°C. Après 24 heures d'agitation de temps à autre, une filtration sur papier Whatman (# 2) a été faite. À partir de cette suspension, un volume de 10 ml a été prélevé pour le dosage des acides gras volatils et une quantité de 100 ml pour doser l' N-NH_3 . L'azote ammoniacal a été mesuré sur une aliquote de 10 mL par distillation avec du MgO (AOAC 1990).

L'extrait pour l'analyse des acides gras volatils et l'acide lactique a été purifié en mélangeant l'extrait à une résine échangeuse de cations (Dowex 50WX8-100). Après un temps d'attente de 10 minutes, l'extrait a été filtré à l'aide d'une seringue-filtre de 0,22 μm . L'échantillon a été congelé à -20°C pour analyse ultérieure.

L'acide lactique a été quantifié sur un appareil de chromatographie ionique (Dionex, modèle DX-500) muni d'une colonne analytique IonPac AS11-HC et d'une colonne de garde AG11-HC. Le système était équipé d'une pompe à gradient GP50, d'un suppresseur d'ions ASRS-ULTRA II, d'un module de détection électrochimique ED40, d'un détecteur à conductivité DS-3 et d'un autoéchantillonneur AS40 muni d'une boucle d'injection de 10 μL . Le débit de l'éluant a été de 1,50 ml min^{-1} en mode isocratique avec un ratio d'éluant de 84 % d'eau déionisée et de 16 % de NaOH 5 mM de 0 à 10 minutes. La colonne a été nettoyée avec un éluant à un ratio de 75 % de NaOH 100 mM et de 25 % d'eau déionisée pendant cinq minutes. Finalement, le système a été rééquilibré pendant cinq minutes avec un éluant au ratio initial de 84 % d'eau déionisée et 16 % de NaOH 5 mM. Le logiciel Peaknet 5.11 a permis l'acquisition des données par intégration des aires sous les pics et les valeurs références de l'acide lactique pour connaître les concentrations.

Le dosage des acides gras volatils a été effectué par chromatographie en phase gazeuse (Varian modèle 3800) à partir d'un auto-échantillonneur modèle CP 8400 muni d'une seringue de 10 mL. Les échantillons de 1,5 μL ont été vaporisés dans l'injecteur (modèle 1177) avec un ratio de division de 1:10 et à une température de 250°C. Le gaz vecteur était l'hélium avec un débit constant de 4 ml min^{-1} . La séparation a été effectuée sur une colonne capillaire (CP-Wax 58/FFAP 50 m x 0,32 mm x 1,2 mm). Le profil de température du four pendant l'élution a été de 85°C pour la première minute, de 85 à 220°C avec une augmentation de 11,5°C

min⁻¹ puis une phase de deux minutes à 272° C. La détection a été réalisée avec un détecteur à ionisation dans la flamme à une température de 250° C avec de l'azote comme gaz d'appoint. Un standard interne d'acide 2-éthylbutyrique a été ajouté à chaque échantillon et de même qu'aux échantillons standards. Le logiciel Star Workstation 6.3 a été utilisé pour contrôler le chromatographe, faire l'acquisition des données, procéder à l'intégration, à l'identification des pics et ainsi déterminer la concentration de chaque acide gras volatil.

3.3.3 Analyses statistiques

Il y a eu trois répétitions pour chacune des combinaisons (souches lactiques x plante x temps d'ouverture) pour un total de 96 silos (2 souches x 2 plantes x 8 ouvertures x 3 répétitions) selon un plan complètement aléatoire. Les silos ont été préparés sur deux périodes, une pour chacun des inoculants. La normalité des données et l'analyse graphique des résidus ont été réalisées avec la procédure Shapiro-Wilk de JMP (SAS Institute, 2003). Les données ont été analysées avec la procédure GLM de JMP (SAS Institute, 2003) où les souches de bactéries lactiques et les deux différentes plantes ont été considérées comme des facteurs fixes alors que les répétitions ont été considérées aléatoires. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test de Tukey avec un seuil de $\alpha = 0,05$.

Les paramètres de modélisation de la cinétique du pH pour chacune des combinaisons ont été prédits en utilisant le modèle statistique non linéaire de Jones *et al.*, (1992) à l'aide de la procédure NLIN de SAS (2001) :

$$pH = pH_a \times \exp^{k(jour-TL)} + pH_z$$

où pH_a est le pH initial moins le pH final, k représente le taux de diminution du pH, pH_z est le pH final déterminé au jour 32, et TL représente le temps de latence avant la baisse rapide du pH.

Le temps de latence (TL) et le taux de diminution du pH (k) ont ensuite été soumis à l'analyse de variance avec PROC MIXED de SAS 9.0 (SAS Institute, 2001) pour déterminer

l'effet des souches de bactéries lactiques et des plantes sur ces paramètres. Les différences entre les moyennes ont été déterminées par les valeurs de F de l'analyse de variance.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Effet des modes de déshydratation sur les caractéristiques biochimiques et microbiologiques des plantes

4.1.1 Effet sur les caractéristiques biochimiques reliées à l'ensilabilité

Les modes de séchage n'ont eu aucun effet ($P > 0,05$) sur les concentrations en nitrates des deux espèces végétales de même que la teneur en matière sèche de la luzerne (Tableau 1). L'analyse statistique a révélé des différences significatives ($P < 0,05$) entre les modes de séchage pour la teneur en matière sèche de la fléole des prés (Tableau 1). Toutefois, les différences mathématiques ont été minimales et ces différences n'ont pu être expliquées.

Les modes de séchage ont eu des effets significatifs ($P < 0,05$) sur le pouvoir tampon. La réponse a été la même pour les deux espèces végétales. La déshydratation par lyophilisation ou au four pendant 48 heures a été la même, alors que le pouvoir tampon au four pendant 72 heures a augmenté comparativement à la lyophilisation (Tableau 1). Une augmentation du pouvoir tampon sur du matériel sec comparativement à du matériel vert a déjà été observée par Muck et Walgenbach (1985). Ces auteurs n'ont toutefois pas donné d'explications reliées à ce phénomène. Pour les sucres solubles, la lyophilisation a permis la meilleure conservation ($P < 0,05$) et ce, pour les deux espèces végétales. Le séchage au four, que ce soit 48 ou 72 heures, a donné les mêmes résultats ($P > 0,05$) (Tableau 1). Ces résultats sont similaires à ceux observés par Smith (1986) qui a comparé la méthode de déshydratation par lyophilisation avec différentes méthodes de séchage au four. L'auteur a observé que la lyophilisation permet de conserver les sucres de façon similaire au matériel vert. Toujours selon Smith (1986), la diminution des sucres solubles par déshydratation à l'air chaud au four

ne permet pas d'inactiver rapidement les enzymes impliquées dans la respiration, ce qui se traduit par une diminution des sucres solubles.

Tableau 1 : Paramètres d'évaluation du potentiel d'ensilabilité pour les deux espèces végétales selon trois traitements de déshydratation.

| Mode de séchage | Matière sèche (g kg ⁻¹) | Nitrates (% MS) | Pouvoir tampon (g d'acide lactique kg ⁻¹ ms) | Sucres solubles (g kg ⁻¹ MS) |
|------------------|--|--------------------|---|--|
| Luzerne | | | | |
| Lyophilisé | 220,4 ^z | 0,08 | 90,5 b | 84,4 a |
| 48 heures à 50°C | 216,4 | 0,08 | 94,2 ab | 60,2 b |
| 72 heures à 50°C | 216,7 | 0,09 | 97,7 a | 55,5 b |
| SEM | 3,51 | 0,006 | 1,74 | 2,41 |
| Fléole des prés | | | | |
| Lyophilisé | 257,3 a ^y | 0,22 | 55,5 b | 89,7 a |
| 48 heures à 50°C | 243,4 b | 0,24 | 58,5 ab | 62,0 b |
| 72 heures à 50°C | 251,7 ab | 0,23 | 60,1 a | 59,1 b |
| SEM | 2,23 | 0,007 | 0,88 | 4,95 |

^z Quatre répétitions par traitement

^y Les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes à $P \leq 0,05$, selon le test de Tuckey. L'absence de lettre indique que l'analyse de la variance a produit une valeur de F non significative.

Tableau 2 : Indices de mesure de la dégradation des protéines suite au séchage des deux plantes fourragères selon trois modes différents

| Mode de séchage | N-Total (g kg ⁻¹ MS) | Azote soluble TCA (g kg ⁻¹ MS) | Dosage des protéines par Bradford (mg ml ⁻¹ d'extrait) |
|-----------------|------------------------------------|--|---|
| Luzerne | | | |
| Lyophilisé | 25,7 ^z | 2,44 a | 41,4 |
| 48 heures | 30,4 | 2,17 b | 35,0 |
| 72 heures | 31,0 | 2,32 ab | 41,8 |
| Vert | | | 42,6 |
| SEM | 1,87 | 0,045 | |
| Fléole des prés | | | |
| Lyophilisé | 19,8 b ^y | 1,64 | 15,3 b |
| 48 heures | 21,5 a | 1,71 | 14,5 b |
| 72 heures | 21,5 a | 1,71 | 15,1 b |
| Vert | | | 32,6 a ^w |
| SEM | 0,40 | 0,041 | |

^z Quatre répétitions par traitement

^y Les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes à $P < 0,05$, selon le test de Tuckey. L'absence de lettre indique que l'analyse de la variance a produit une valeur de F non significative.

^w Comparaison avec le matériel vert par test de Dunnett.

4.1.2. Effets sur les teneurs en protéines et leur qualité

Les modes de séchage n'ont eu aucun effet ($P > 0,05$) sur les concentrations en azote total de la luzerne alors que pour la fléole des prés, la lyophilisation a donné les concentrations les plus faibles comparativement aux deux modes de séchage au four (Tableau 2). Il est difficile d'expliquer ces résultats puisque le séchage par lyophilisation réduirait les pertes de certains éléments plus volatils par rapport à un séchage au four (Uchida 1987). Par ailleurs, Reed et Belyea (1997) ont observé des résultats similaires sur la protéine brute en comparant la lyophilisation, le four et le four à micro-ondes. Nous avons voulu évaluer si les modes de séchage avaient un effet sur la dégradation des protéines, tel que mesuré par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA). Des différences significatives ($P < 0,05$) ont été observées chez la luzerne entre les modes de séchage, mais aucune différence ($P > 0,05$) chez la fléole des prés (Tableau 2). La mesure de l'azote soluble au TCA est une façon de mesurer la protéolyse végétale. Selon McDonald *et al.* (1991), l'azote soluble des plantes représente entre 10-20 % de l'azote. Dans la présente étude, les teneurs en azote soluble des plantes, que ce soit la luzerne ou la fléole des prés, ont été en moyenne de 8 % de l'azote total. Ceci indiquerait que les protéines des plantes n'ont pas été endommagées par les traitements de séchage. Les différences observées pour la luzerne ont été significatives mais ne sont pas numériquement importantes. Cette bonne conservation des protéines pourrait s'expliquer par une manipulation rapide des échantillons entre la récolte et la mise au séchoir et par une faible activité des différents processus de dégradation des protéines, principalement celles des protéases (Polan *et al.* 1998). Il est aussi possible d'expliquer cette faible dégradation des protéines par une réduction rapide de la protéolyse suite à l'inactivation des enzymes impliqués parallèlement à la réduction de l'activité hydrique a_w (Muck *et al.* 2003).

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford n'a pas révélé de différences significatives entre les trois modes de séchage et le matériel vert (conservé au congélateur) pour la luzerne (Tableau 2). Toutefois, pour la fléole, le matériel vert (conservé au congélateur) avait des teneurs plus élevées ($P < 0,05$) que chacun des modes de séchage indiquant une dégradation des protéines (Tableau 2). Il est probable que cette différence chez la fléole ne soit pas attribuable à une dégradation mais plutôt à des difficultés d'extraction

comparativement à la luzerne. Un traitement mécanique au mélangeur « Waring Blender » a été appliqué sur le matériel frais contrairement aux échantillons secs (méthodes de séchage). Celui-ci aurait donc permis de libérer plus de protéines pour la fléole des prés que pour la luzerne en comparaison du matériel sec. Cette hypothèse est plausible dans la mesure où l'étude qualitative des protéines sur gel d'électrophorèse n'a pas démontré de dégradation entre les modes de séchage et le matériel vert (Figure 6). Les profils de densité issus de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE sont demeurés similaires entre les extraits des trois modes de séchage et le matériel vert (Figure 6). Une différence de profil entre les traitements aurait permis de conclure à une dégradation de certaines protéines. La similitude entre les profils est facilement observable pour les échantillons de luzerne dans les puits 2 à 4 (Figure 6). Les profils issus de la fléole des prés sont moins denses que ceux de la luzerne, mais ils demeurent similaires entre les traitements. L'observation par électrophorèse confirme que la déshydratation du matériel végétal n'affecte pas la qualité des protéines.

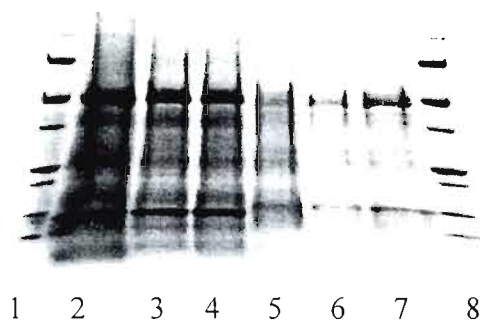


Figure 6: Comparaison de l'état des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE permettant de vérifier l'effet du mode de séchage sur la protéine brute des deux espèces de plantes fourragères (fléole et luzerne). Puits 1 et 8 : standard de poids moléculaires; puits 2 à 4, luzerne séchée par lyophilisation, four 50° C 48 h et four 50° C 72 h; puits 5 à 7, fléole séchée par lyophilisation, four 50° C 48 h et four 50° C 72 h.

4.1.3. Effet sur les caractéristiques microbiologiques

Les traitements de déshydratation par séchage au four à 50° C pendant 72 heures et par lyophilisation ont réduit sous le seuil de détection les bactéries lactiques, les levures et les bactéries butyriques, et ce, autant pour la luzerne que pour la fléole (Tableau 3). Avec le séchage au four à 50° C pendant 48 heures, des résultats identiques sont observés à l'exception du dénombrement des bactéries lactiques sur milieu gélosé MRS (Tableau 3). Pour ce milieu, un nombre de 2,2 pour la luzerne et de 4,1 \log_{10} UFC g⁻¹ MS pour la fléole a été observé. Ce milieu étant moins restrictif que le milieu Rogosa, il permet la croissance de certaines bactéries Gram négatives, ce qui pourrait expliquer les résultats observés. La taille des populations épiphytes des bactéries lactiques, levures et bactéries butyriques est généralement faible (Pahlow *et al.*, 2003). Il est donc normal de ne plus observer ces populations après les traitements de déshydratation. Pour ce qui est des dénombrements des entérobactéries, un groupe de bactéries souvent retrouvées sur les plantes fourragères, il est fréquent de les retrouver à un niveau variant entre 10³ à 10⁶ UFC g⁻¹ FF. Pour la fléole des prés, les dénombrements ont été inférieurs ($P < 0,05$) avec un séchage de 48 ou 72 heures au four par rapport à la lyophilisation (Tableau 3). Pour les échantillons de luzerne, aucune différence n'a été observée entre le traitement de 48 heures au four et la lyophilisation pour ce qui est du nombre d'entérobactéries (Tableau 3). Ces résultats sont semblables à ceux observés par Müller *et al.* (1993), qui ont démontré que le séchage tend à augmenter le nombre de ces microorganismes si le nombre était inférieur à 10⁵ UFC g⁻¹ FF lors de la fauche et pourrait être réduit si le nombre était supérieur à 10⁵ UFC g⁻¹ FF, ce qui a été le cas de la fléole des prés (Tableau 3).

Les dénombrements des moisissures et des levures ont été plus faibles ($P < 0,05$) avec la lyophilisation que pour les modes de séchage au four et ce, pour les deux espèces (Tableau 3). Il n'est pas possible d'affirmer que les moisissures ont augmenté avec le séchage au four puisque les échantillons à lyophiliser ont d'abord été congelés à -20° C. Cette congélation pourrait avoir affecté la survie des moisissures. Ces résultats diffèrent de ceux observés par Lin *et al.* (1992) qui ont démontré que le nombre de levures et moisissures n'a pas été affecté

par le séchage malgré le fait qu'une corrélation positive entre la température et le nombre de ces microorganismes ait été observée.

Les dénombrements microbiens démontrent que l'effet de la déshydratation a permis de réduire le nombre de bactéries de plusieurs populations sous le seuil de détection. Par contre, deux des populations plus problématiques pour l'obtention d'un ensilage de qualité n'ont pas été affectées par les traitements de déshydratation. Dans le but d'éliminer ces populations, les échantillons ont subi une irradiation. L'ensemble des dénombrements a de nouveau été effectué sur les échantillons irradiés. Ces dénombrements ont tous été sous le seuil de détection (données non présentées).

4.1.4 Sélection des traitements du matériel végétal

Suite à l'ensemble des résultats obtenus à partir des analyses biochimiques et des dénombrements, la préparation du matériel végétal sera la suivante : (1) lyophilisé avant le broyage à 8 mm; (2) le matériel sera ensuite irradié afin d'éliminer les populations de microorganismes indésirables pour les essais de fermentation en silos.

Tableau 3 : Moyennes des dénombrements microbiens pour les deux plantes pour chaque mode de séchage (\log_{10} UFC g^{-1} fourrage sec)

| Modes de séchage | Entérobactéries | Bactéries lactiques sur Rogosa | Bactéries lactiques sur MRS | Levures | Moississures | <i>Clostridium</i> |
|------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------|--------------|--------------------|
| Luzerne | | | | | | |
| Lyophilisation | 5,3 ^z ab ^y | <2 | < 2 | <2 | 3,4 b | <2 |
| 48 heures | 5,6 a | <2 | 2,2 | <2 | 5,2 a | <2 |
| 72 heures | 5,0 b | <2 | <2 | <2 | 5,0 a | <2 |
| Fléole des prés | | | | | | |
| Lyophilisation | 6,0 a | <2 | <2 | <2 | <2 b | <2 |
| 48 heures | 5,1 b | <2 | 4,1 | <2 | 4,6 a | <2 |
| 72 heures | 4,8 b | <2 | < 2 | <2 | 4,7 a | <2 |

^z Moyenne de quatre répétitions par traitement

^y Les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes à $P < 0,05$ selon le test de Tukey. L'absence de lettre indique que l'analyse de la variance a produit une valeur de F non significative.

4.2. Répétitivité des silos

Les résultats obtenus démontrent que le pH de stabilité anaérobie (pH_w) (Wieringa, 1969) a été atteint (baisse de pH de 5,72 à 4,06; $pH_w = 4,50$) pour la fléole et pour la luzerne (baisse du pH de 5,44 à 4,26; $pH_w = 4,53$). La baisse de pH s'est produite dans tous les silos avec les trois niveaux de vide testés. Pour les silos dont le vide a duré cinq secondes, le pH des dix répétitions a atteint $4,27 \pm 0,04$ et $4,06 \pm 0,03$ pour la luzerne et la fléole respectivement. Après 40 secondes de vide, le pH moyen a atteint $4,24 \pm 0,04$ et $4,06 \pm 0,02$ pour la luzerne et la fléole respectivement. Avec un vide de 85 secondes, le pH moyen était de $4,27 \pm 0,05$ et de $4,06 \pm 0,02$ pour la luzerne et la fléole respectivement. La reproductibilité de la technique de fabrication de silos a été donc possible pour les trois niveaux de vide. En ce qui concerne le test des trois niveaux de vide, bien que le niveau de vide 40 secondes a été retenu pour l'expérience subséquente, l'analyse des résultats ne démontre aucune différence significative, et ce, autant pour la luzerne que pour la fléole. Après 40 secondes de vide, nous constatons que la différence de pH entre les échantillons permet l'obtention d'un coefficient de variation mathématiquement plus faible pour les deux espèces végétales avec une valeur de 0,54 % fléole et de 0,90 % pour la luzerne. Ces résultats sont similaires à ceux qui avaient été observés par Johnson *et al.* (2005) en comparant des silos en sacs de polyéthylène emballés sous vide avec des silos préparés dans des tubes de verre.

4.3. Évaluation de l'efficacité des deux souches lactiques

La cinétique du pH a été modélisée selon l'équation présentée par Jones *et al.* (1992) où le pH_a est le pH initial moins le pH final, le pH_z est le pH final déterminé au jour 32, k est le taux de diminution du pH par jour, alors que TL est le temps de latence avant d'observer une chute de pH. Par la suite, pour étudier l'efficacité des deux souches IA-18 et GIA-15, les paramètres k et TL ont été utilisés puisque ces deux paramètres sont des facteurs importants pour la fermentation (Kung *et al.*, 2003).

Pour chacune des combinaisons plante x bactérie lactique x répétitions, le meilleur modèle pour déterminer celui qui décrivait le mieux les données de pH enregistrées à toutes les ouvertures des silos, a été sélectionné à l'aide de l'AIC (Akaike Criteria) de la procédure NLIN de SAS (2001). Toutes les combinaisons ont été mieux ajustées avec le modèle à trois paramètres (pH_a , pH_z et k) à l'exception de la combinaison luzerne x GIA-15 où le modèle à quatre paramètres (pH_a , pH_z , k et TL) a été le meilleur (Figure 7). Ces résultats ont indiqué que la souche GIA-15 a un comportement différent selon qu'elle a été inoculée avec la fléole des prés ou la luzerne. Ces résultats ont aussi été confirmés par l'analyse de variance des données du TL qui indiquent une interaction significative entre les souches de bactéries lactiques et les plantes (Tableau 4). Pour la souche IA-38, aucun TL n'a été observé avant d'avoir une chute de pH et ce, pour les deux espèces végétales ($P > 0,05$) alors que pour la souche GIA-15, la souche inefficace, le TL a été différent selon l'espèce végétale. Avec la fléole des prés, le TL , avant d'avoir une chute de pH, a été nul alors que pour la luzerne, le temps de latence a été de 0,9 jour. Avec des silos expérimentaux, Jones *et al.*, (1992) ont observé un TL de 0,42 jour pour des ensilages de luzerne sans inoculation et un TL de 0,05 pour des ensilages de luzerne inoculés avec un inoculant lactique. La luzerne avait une teneur en matière sèche similaire à celle de notre étude, soit 33 %. Ces TL sont inférieurs à ceux de la présente étude, mais il s'agissait de matériel végétal n'ayant pas subi de déshydratation avant ensilage. La flore épiphyte peut aussi contribuer à l'acidité de la plante, donc pourrait avoir un effet sur cette différence.

Jaster (1995) rapporte que les bactéries lactiques doivent atteindre 10^8 UFC g^{-1} FF avant qu'une diminution de pH appréciable puisse être observée. Les dénombrements réalisés à

chacune des ouvertures sont en étroite relation avec les observations faites quand au temps de latence avant la diminution du pH. Avec la souche GIA-15, après 24 heures, ce seuil n'a pas encore été atteint alors que pour les autres combinaisons plante et bactéries lactiques, ce seuil a été dépassé (Figure 8). Il faut toutefois mentionner qu'il est possible que le temps de latence n'ait pu être observé chez la fléole des prés avec la souche GIA-15 en raison des temps d'ouverture choisis au préalable. En effet, il aurait probablement fallu qu'il y ait une ou des ouvertures supplémentaires avant 24 heures, ce qui aurait permis une meilleure précision dans l'ajustement du modèle.

Le taux de diminution du pH (paramètre k) a été plus rapide pour la souche IA-38 que pour la souche GIA-15. Toutefois, la réponse a été différente selon la plante (Tableau 4). Avec la souche efficace IA-38, le taux de diminution du pH chez la luzerne a été de 1,5 unité de pH par jour alors que celui de la fléole des prés a été de 2,0. Cette différence pourrait s'expliquer par le pouvoir tampon de la plante qui est plus élevé pour la luzerne avec 58,9 g d'acide lactique kg^{-1} MS alors que pour la fléole des prés (33,6 g d'acide lactique kg^{-1} MS). Le pouvoir tampon est la capacité d'une plante à résister au changement de pH (McDonald *et al.* 1991). Ainsi, pour une même quantité d'acide lactique produite, le pH des ensilages de luzerne chutera plus lentement puisque la plante offre une résistance plus grande à la diminution du pH. Avec la souche inefficace GIA-15, les résultats observés ont été contraires à ceux de la souche IA-38. Pour la souche GIA-15, la diminution du pH par jour a été plus élevée pour la luzerne que pour la fléole des prés. Le taux de diminution du pH a été de 0,8 unité de pH par jour pour la luzerne et de 0,3 pour la fléole des prés. Cette différence de fermentation entre les deux espèces végétales pour la souche GIA-15 est intéressante étant donné que les types de sucres contenus dans la fléole des prés et la luzerne sont différents, du moins, en ce qui concerne les sucres de réserve (Fenlon *et al.*, 1995). Le manque de substrat ne semble pas être un facteur pouvant expliquer ces différences. Les teneurs en sucres solubles étaient de 108,7 g SS kg MS^{-1} pour la fléole des prés et de 97,8 g SS kg MS^{-1} pour la luzerne, ce qui semble avoir été suffisant pour la souche IA-38. Il est possible que d'autres substances nécessaires à la croissance de la souche GIA-15 se retrouvent dans les légumineuses et non pas dans les graminées, ce qui pourrait expliquer les différences observées.

Malgré des différences entre les deux espèces végétales utilisées dans la présente étude, la souche IA-38 a donné de meilleurs résultats avec la luzerne et la fléole des prés. Il n'y a pas eu de temps de latence et le taux de diminution du pH a été plus élevé que celui de la souche GIA-15 indiquant que la souche IA-38 serait plus efficace. Ces résultats confirment les informations provenant de la compagnie qui nous a fourni les souches.

L'étude des produits de fermentation est aussi une façon de déterminer les différences entre les souches puisqu'ils permettent de voir l'orientation de la fermentation en relation avec la qualité de fermentation (Kung *et al.*, 2003). Il n'y a pas eu de différence significative ($P > 0,05$) entre les souches ou entre les plantes pour les paramètres de l'azote ammoniacal, les concentrations en éthanol et en acide propionique (Tableau 5). Aucune teneur en acide butyrique n'a été détectée dans les silos. L'azote ammoniacal a été inférieur à 2,0 % de l'azote total, ce qui pourrait être relié à l'absence des entérobactéries puisqu'à la section 4.1.3, il a été démontré qu'après irradiation, les entérobactéries étaient sous le seuil de détection. De plus, il est possible que l'activité enzymatique ait été réduite suite la déshydratation et la réhydratation, diminuant ainsi la protéolyse naturelle des plantes. Pour les paramètres de pH, les teneurs en acide lactique et acétique, il y a eu des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les inoculants lactiques et les plantes (Tableau 5). Toutefois, la réponse pour chacune des souches a été différente pour chaque espèce végétale, tel que démontré par une interaction significative ($P \leq 0,05$) entre les souches et les plantes pour ces trois paramètres (Tableau 5).

Pour la luzerne, le pH mesuré au Jour 32 et les concentrations en acide lactique ont été les mêmes ($P > 0,05$) pour chacune des souches alors qu'il y a eu une différence significative pour les concentrations en acide acétique ($P \leq 0,05$) (Tableau 6). Toutefois, d'un point de vue biologique, cette différence statistique n'est pas importante. Pour la fléole des prés, les différences entre les souches pour ces mêmes paramètres de fermentation ont toutes été significatives ($P \leq 0,05$). La souche GIA-15 a produit moins d'acide lactique et d'acide acétique et conséquemment, le pH des ensilages correspondants a été plus élevé que pour la souche IA-38.

L'utilisation des paramètres de fermentation pour évaluer l'efficacité des souches n'a pas permis l'obtention de résultats similaires à ceux obtenus avec les paramètres de la cinétique du pH. Avec la luzerne, les deux souches ont été efficaces puisque le pH final atteint a été le même et les teneurs en acide lactique et acétique ont été sensiblement les mêmes d'un point de vue biologique (Tableau 6).

La souche GIA-15 a eu un temps de latence important au départ chez la luzerne. Malgré un taux de diminution du pH plus faible que celui de la souche IA-38, les courbes modélisées de la Figure 7 indiquent que la fin de la diminution rapide du pH a été atteinte un peu plus tard pour la souche GIA-15 que pour celle de la souche IA-38. Toutefois, le substrat a été suffisant pour continuer la fermentation et ainsi atteindre les mêmes caractéristiques de conservation pour les paramètres de pH, d'acide lactique et d'acide acétique.

Ainsi, avec le type de silo développé dans cette étude, il est possible d'évaluer l'efficacité des souches de bactéries lactiques. Le temps de latence et le taux de diminution du pH ont permis de démontrer que la souche GIA-15 est moins efficace que la souche IA-38. Avec les produits de fermentation au Jour 32, l'inefficacité de la souche GIA-15 a été démontrée seulement avec la fléole des prés. Ainsi, pour un tamisage rapide entre les souches, l'utilisation des paramètres de la cinétique de fermentation pourrait être avantageuse et permettrait des économies de temps en analyse biochimique puisqu'elle ne nécessite que des mesures de pH.

Tableau 4: Effet des souches de bactéries lactiques et des plantes sur la cinétique du pH

| Paramètres de la cinétique | Bactéries lactiques (BL) | | | Espèces végétales (EV) | | | Probabilités | | |
|---|--------------------------|-------|------|------------------------|---------|------|------------------|-----|---------|
| | GIA-15 | IA-38 | SEM | Fléole | Luzerne | SEM | BL | EV | BL x EV |
| Temps de latence – TL (jour) | 0,47 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,47 | 0,01 | *** ^z | *** | *** |
| Taux de diminution k (pH jour ⁻¹) | 0,54 | 1,72 | 0,04 | 1,13 | 1,14 | 0,04 | *** | NS | *** |

^z *** = $P \leq 0,0001$; NS = $P > 0,05$.

Tableau 5: Analyse de variance des paramètres de fermentation des silos au jour 32

| Paramètres | pH | Éthanol | Acide lactique | Acide acétique | Acide propionique | N-NH ₃ |
|-----------------|-----------|---------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| | | | | Valeurs de F | | |
| Souches | 38,49 ** | 1,00 | 22,02 ** | 15,05 ** | 4,50 | 2,01 |
| Plantes | 2,65 | 1,72 | 47,06 *** | 50,01 *** | 3,56 | 1,83 |
| Souches*Plantes | 48,72 *** | 1,00 | 9,57 * | 35,56 ** | 3,56 | 1,50 |

NS= $P > 0,05$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$

Tableau 6: Moyennes des valeurs des paramètres de fermentation des silos influencés par la souche et la plante après 32 jours de fermentation.

| Plantes | Souches | pH | Acide lactique (g kg ⁻¹ MS) | Acide acétique (g kg ⁻¹ MS) |
|---------|---------|--------|---|---|
| Luzerne | IA-38 | 4,42 | 66,6 | 11,9 a ^z |
| | GIA-15 | 4,39 | 61,2 | 13,5 b |
| Fléole | IA-38 | 4,19 a | 53,8 a | 11,1 a |
| | GIA-15 | 4,75 b | 27,3 b | 3,7 b |

^z Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon $P < 0,05$ selon le test de Tuckey. L'absence de lettre indique que l'analyse de la variance a produit une valeur de F non significative.

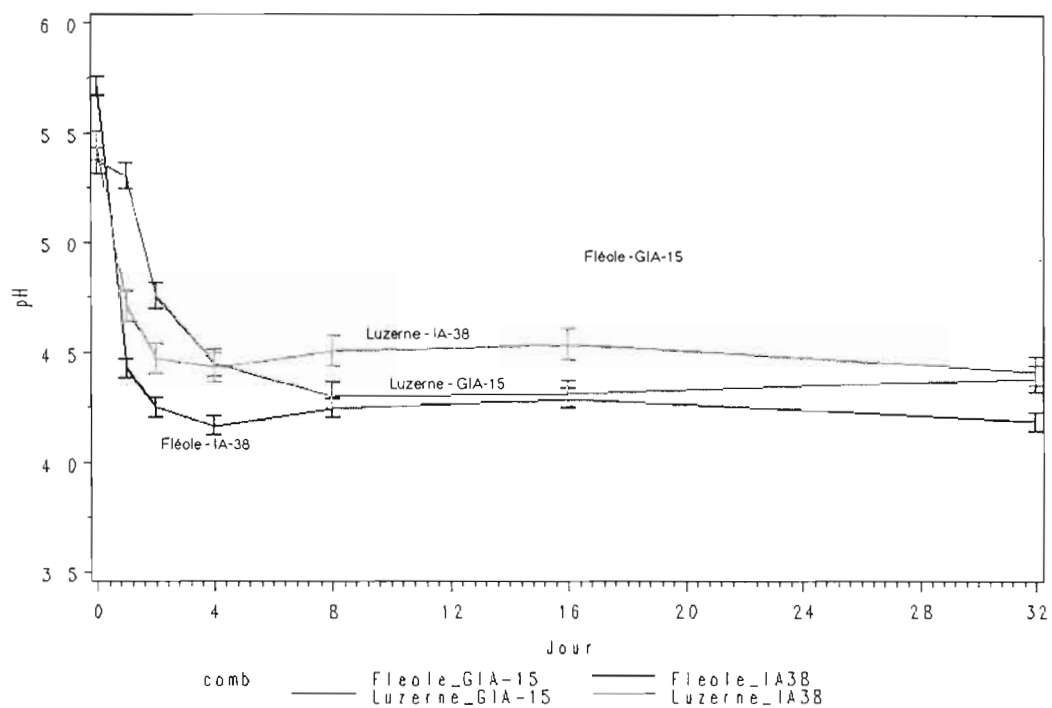


Figure 7 : Ajustement de la cinétique du pH réalisé suite aux itérations effectuées par le modèle non linéaire de SAS (SAS Institute, 2001) pour l'étude des cinétiques d'acidification des silos de fléole et de luzerne inoculés avec les souches de bactéries lactiques IA-38 et GIA-15.

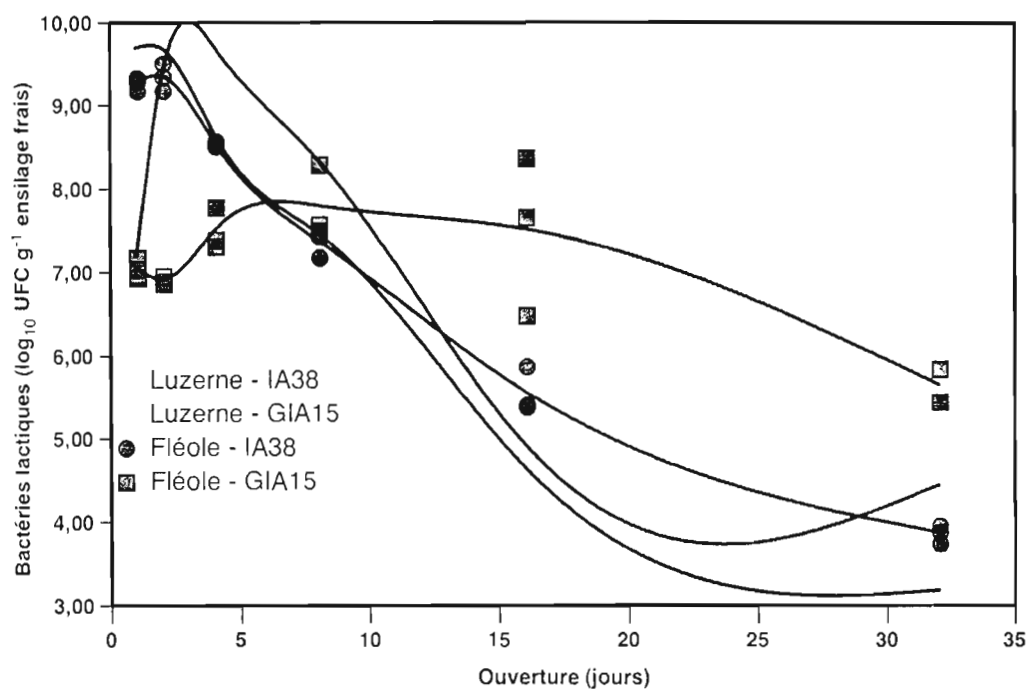


Figure 8 : Dénombrements des bactéries lactiques réalisés sur les silos des cinq premières ouvertures suite à la mise en silo du matériel végétal de la fléole et de la luzerne inoculées par les souches de bactéries lactiques IA-38 et GIA-15.

CONCLUSION

La déshydratation du matériel végétal par lyophilisation est la meilleure méthode pour sécher la luzerne ou la fléole des prés. Cela a permis de maximiser les caractéristiques d'ensilabilité dont les teneurs en sucres solubles et le pouvoir tampon. Les teneurs en protéines et la qualité de celles-ci n'ont pas été affectées par les différents modes de déshydratation.

D'un point de vue microbiologique, les modes de séchage ont eu certains effets mais n'ont pas permis de préconiser une méthode de séchage plutôt qu'une autre. Par ailleurs, la survie de certains microorganismes a été surprenante compte tenu des traitements de séchage. Les groupes de microorganismes qui ont survécu à la déshydratation pouvaient influencer la fermentation lactique, il a donc été décidé d'irradier le matériel végétal.

La méthode des silos dans des sacs de polyéthylène sous vide est rapide et répétitive. Elle pourrait permettre le tamisage de souches de bactéries lactiques dans un programme de développement d'inoculant pour les ensilages. Cette méthode pourrait aussi permettre l'étude de l'interaction entre les souches ou encore d'étudier d'autres facteurs inhérents à la fermentation de l'ensilage.

RÉFÉRENCES

- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. in Serie: Ensiling Process. Published in August 9, 2004 (Government of Ontario).
- AOAC. 1990. Official methods of analysis (15th Ed.). Association of official analytical chemists, Washington, DC.
- Berthiaume, R., Lafrenière, C., Petit, H., Lapierre, H. et Robitaille, L. 1998. Stratégies permettant de maximiser la valeur alimentaire des fourrages. Symposium Bovins Laitiers, CPAQ, Saint-Hyacinthe, Québec.
- Buxton, D. R. et O'Kiely, P. 2003. Preharvest plant factors affecting ensiling. p199-250. *In*: Silage science and technology. Buxton, D. R., Muck, R. E., Harrison, J. H., (ed). Madison, Wisconsin, USA.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. et Young, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6: 71-80.
- Cherney, J. H. et Cherney, D. J. R. 2003. Assessing Silage Quality. p141-198 p. *in*: Silage Science and Technology. Buxton, D. R., Muck, R. E. et Harrison, J. H., (ed). Madison, Wisconsin, USA.
- Cussen, R. F., Merry, R. J., Williams, A. P. et Tweed, J. K. S. 1995. The effect of additives on the ensilage of forage of differing perennial ryegrass and white clover content. *Grass and Forage Science.* 50: 249-258.
- Davies, D. R., Merry, R. J., Williams, A. P., Bakewell, E. L., Leemans, D. K. et Tweed, J. K. S. 1998. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *Journal of Dairy Science.* 81: 444-453.
- Demarquilly, C. 1998. Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. *INRA Prod. Anim.* 11 (5): 359-364.
- Driehuis, F. et Van Wikselaar, P.G. 1996. The occurrence of alcoholic fermentation in high dry matter grass silages. p254-255 *in*: Proceedings of the XIth International Silage Conference, University of Wales, UK. Stapeldon Library, Aberystwyth, UK.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28: 350-356.
- Fairbairn, R., Alli, L. et Baker B.E. 1988. Proteolysis associated with the ensiling of chopped alfalfa. *J. Dairy Sci.* 71:152-158.
- Fenlon, D. R., Henderson, A. R. et Rooke J. A. 1995. The fermentative preservation of grasses and forage crops. *J. Appl. Bacteriol.* 79:118S-131S.

- Grum, D.E. Shockey, W.L. et Weiss, W.P. 1991. Electrophoretic examination of alfalfa silage proteins. *J. Dairy Sci.* 74:146-154.
- Harman, E., Ruser, B. et Pahlow, G. 2002. *in vitro* forage model for measuring osmotolerance of microbial treatments. p418-420 *in*: Conference Proceedings of The XIIIth International Silage Conference, September 11-13, Auchrincruive, Scotland.
- Jaster, E. H. 1995. Legume and grass silage preservation. Pages 91-115 *in* CSSA Special publication no. 22. Post-harvest physiology and preservation of forages. Madison, Wisconsin.
- Johnson, H.E., Merry, R.J., Davies, D.R., Kell, D.B., Theodorou, M.K. et Griffith, G.W., 2005. Vacuum packing: A model system for laboratory-scale silage fermentations. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 106-113.
- Jonsson, A. 1990. Enumeration of *Clostridium tyrobutyricum* in silage using Neutral Red, D-cycloserine and lactate dehydrogenase. *Journal of Dairy Science* 73:719-725.
- Jones, B.A., Satter, L.D. et Muck, R. E. 1992. Influence of bacterial inoculant and substrate addition to lucerne ensiled at different dry matter contents. *Grass and Forage Science* 47: 19-27.
- Kaiser, E., Weiss, K. et Polip, I. 2002. A new concept for the estimation of the ensiling potential of forages. p344-357. *in*: Proceedings of The XIIIth International Silage Conference, September 11-13, Auchrincruive, Scotland.
- Keady, T. W. J. et O'Kiely, P. 1996. An evaluation of the effects of rate of nitrogen fertilization of grassland on silage fermentation, in-silo losses, effluent production and aerobic stability. *Grass and Forage Science*. 51: 350-362.
- Kung, L. Jr., Stokes, M. R. et Lin, C. J., 2003. Silage Additives. 305-360 p. *In* Silage Science and Technology. Buxton, D. R., Muck, R. E., Harrison, J. H., (ed). No, 42. ASA, CSSA, et SSSA, Madison, WI.
- Laemmli, U. E. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227: 680-685.
- Lafrenière, C. 2002. Étude de l'ensilabilité et des bactéries lactiques épiphytes des graminées et leurs effets sur la fermentation et la conservation des ensilages entreposées en silo-meule. Thèse de doctorat. Université Laval, Ste-Foy (Qc). 141p.
- Lafrenière, C. et Berthiaume, R. 2000. Effet de deux types d'inoculants lactiques sur la stabilité aérobie d'un ensilage d'avoine haché récolté à deux stades de maturité. p48-51. Dans : Demi-Journée d'information scientifique sur les fourrages, CPVQ Inc. Eds. Victoriaville, Qc.
- Lafrenière, C. et Berthiaume, R. 2005. Qualité des fourrages : la récolte et l'ensilage. p123-133 *in* : 41st Eastern Nutrition Conférence 10-11 may. Montréal (Qc).
- Licitra, G., Hernandez, T.M. et Van Soest, P.J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 57: 347-358.
- Lin, C., Bolsen, K. K., Brent, B. E., Hart, R. A. et Dickerson, J. T. 1992. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *Journal of Dairy Science*. 75: 2484-2493.

- McDonald, P. et Henderson, A. R. 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 13: 395-400.
- McDonald, P., Henderson, N. et Heron, S. 1991. The biochemistry of silage. 2^{ème} édition. Chalcombe publications, UK 340 p.
- Merry, R.J., Lowes, K.F. et Winters, A., 1997. Current and future approaches to biocontrol in silage. p17-27. *in*: V. Jambor, V., Klapil, L., Chromec, P. et Prochazka, P. (ed) Prod. 8th Int. Symposium Forage Conservation, Brno, Czech Republic. 29 Sept -1 Oct. 1997. Research Institute of Animal Nutrition, Pohorelice, Czech Republic.
- Mertens, D. R. 1992. Determining dry matter in diverse types of feeds. Page B1-B12. *in* NFTA Forage analysis workshop, Denver, Colorado.
- Muck, R. E., Moser, L. E. et Pitt, R. E. 2003. Postharvest factors affecting ensiling. p251-304. *in*: Silage science and technology. Agron. Monogr. 42. ASA, CSSA, et SSSA, Madison, WI.
- Muck, R. E. et Walgenbach, R. P. 1985. Variations in alfalfa buffering capacity. Proceedings of ASAE (paper 85-1535). St-Joseph, Michigan.
- Müller, M., Müller, T. et Seyfarth, W. 1993. Veränderungen der microbiellen Epiphytenflora beim Welken von Futtergrasern und deren mögliche Auswirkungen auf den Siliererfolg. *Agrobiol. Res.* 46:28-39.
- O'Donnell, C., William, A. G. et Biddlestone, A. J. 1997. The effects of pressure and stage of ensilage on the mechanical properties and effluent production potential of grass silage. *Grass and Forage Science*. 52: 12-26.
- O'Kiely, P. et Wilson R. K. 1991. Comparison of three silo types used to study in-silo processes. *Irish J. Agric. Res.* 30:53-60.
- Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H.K. et Cai, Y., 2002. Silage and microbial performance, old story but new problems. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 36:59-71.
- Owens, V. N., Albrecht, K. A. et Muck, R. E. 1999a. Protein degradation and ensiling characteristics of red clover and alfalfa wilted under varying levels of shade. *Canadian Journal of Plant Science*. 79:209-222.
- Owens, V. N., Albrecht, K. A., Muck, R. E. et Duke, S. H. 1999b. Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total non-structural carbohydrates. *Crop Science*. 39: 1873-1880.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. et Spoelstra, S. F. 2003. Microbiology of ensiling. p31-93. *In*: Silage science and technology. Agron. Monogr. 42. ASA, CSSA, et SSSA, Madison, WI.
- Papadopoulos, Y.A. et McKersie, B.D. 1983. A comparison of protein degradation during wilting and ensiling of six forage species. *Canadian Journal of Plant Science*. 63: 903-912.
- Paragon, B.M. 2004. Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires. Comité d'Experts spécialisé Alimentation Animale. INRA. 90 pages.

- Polan, C. E., Stieve, D. E. et Garrett, J. L. 1998. Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. *J. Dairy Sci.* 81 :765-776.
- Reed, E. A. et Belyea, R. L. 1997. The effects of oven drying on the composition and degradability characteristics of animal selected forages. *J. Dairy Sci.* 80 (suppl. 1): 221.
- SAS Institute, Inc. 2001. SAS user's guide: Statistics. Version 9. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina.
- SAS Institute, Inc. 2003. JMP IN 5.1 software. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina.
- Savoie, P. et Tremblay, G. F. 1998. La conservation des aliments ensilés et leur effet sur les ruminants. Conférence présentée au congrès du bœuf (CPAQ). 16 pages.
- Smith, D. 1986. Removing and analyzing total non-structural carbohydrates from plant tissues. Research Report 41. College of Agricultural and Life Sciences. University of Wisconsin.
- Tremblay, G., Petit, H., Berthiaume, R., et Fournier, A. 2005. La gestion des fourrages pour l'alimentation des ruminants. p191-200 *Dans* : Bélanger, G., Couture, L. et Tremblay, G. (éds.), *Le guide des plantes fourragères*. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec.
- Weinberg, Z.G. et Muck, R.E., 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiological Review.* 19: 53-68.
- Weissbach, F., Schmidt, L. et Hein, E. 1974. Method of anticipation of the run of fermentation in silage making based on chemical composition of green fodder. p663-672 in *Proceedings of the 12th international Grassland Congress*, Moscou.
- Weissbach, F. 1996. New developments in crop conservation. p11-25 *in*: *Proceedings of the XIth International Silage Conference*, University of Wales, UK. Stapeldon Library, Aberystwyth, UK.
- Wieringa, G. W. 1969. Influence of moisture and nutrient content of forage plants on fermentation processes. Pages 133-137 *in* *Proceeding of the 3rd General Meeting of the European Grassland Federation*, Braunschweig, Allemagne.